中国生物工程杂志　China Biotechnology,2017,37(7):56-63

DOI:10.13523/j.cb.20170711

CodY 在单核细胞增生李斯特菌运动和毒力方面的作用*

张　颖　汤雨倩　沈　怡　罗　勤**
（华中师范大学生命科学学院　遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室　武汉　430079）

摘要　目的:探究全局性转录调控因子 CodY 在单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)鞭毛运动和细菌毒力方面的作用。方法:通过同源重组的方法敲除 Lm 染色体上 CodY 的编码基因 *codY* 并成功构建缺失菌株的回复菌株;利用平板泳动法观测鞭毛运动的变化,RT-qPCR 检测与鞭毛运动相关基因的转录表达;比较野生型菌株 EGDe 与 CodY 缺失菌株对细菌溶血活性、棉铃虫幼虫的半致死剂量和主要的毒力因子 LLO 和毒力基因调控蛋白 PrfA 转录表达的影响。结果:同野生型菌株相比,CodY 缺失菌株鞭毛运动和相关基因,以及主要的毒力因子 LLO 和 PrfA 的转录表达显著降低($P \leq 0.01$),溶血活性显著降低($P \leq 0.01$),对棉铃虫幼虫的半致死剂量上升了 5.8 倍。结论:CodY 在 Lm 鞭毛运动和细菌毒力调控方面具有重要作用。

关键词　单核细胞增生李斯特菌　CodY　鞭毛运动　毒力
中图分类号　[Q815]

CodY 是一种广泛存在于低 G+C 含量的革兰氏阳性菌中的全局转录调控因子,能够调控碳代谢、氮代谢、氨基酸生物合成、胞外物质的运输和降解、抗生素的合成、鞭毛以及早期芽孢形成等多种代谢途径和细胞生理过程[1]。在枯草芽孢杆菌中,CodY 能调控大约 200 个基因的表达[2],主要涉及与鞭毛运动和氨基酸转运相关基因[3-4]。在金黄色葡萄球菌中,CodY 既可以通过识别并高效结合到靶基因启动子上的一个保守的 15bp 的回文序列 AATTTTCWGAAAATT,即 CodY-box 上,直接调控毒力基因的表达,也可以通过调控 agr(在金黄色葡萄球菌中,agr 是全局性调控因子,调控多种毒力基因的表达),间接调控毒力基因的表达[5-7]。

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)是革兰氏阳性食源性致病菌。由 Lm 引起的疾病称为李斯特菌病,其主要的症状为脑膜炎和败血症,以及孕妇流产。因其高致死率(20% ~30% 感染者死亡)而被世界卫生组织(WHO)列入四大食源性致病菌之一[8-10]。Lm 可以通过吞噬作用或表达内化素蛋白,侵入宿主细胞;在细胞溶血素 LLO(*hly* 基因编码)、两种磷脂酶(PlcA、PlcB)的作用下,逃脱吞噬泡,进入宿主细胞质[11];进入宿主细胞质的 Lm 在 ActA 的作用下,快速复制,进行细胞之间的传播。这些重要的毒力因子的转录表达都受到 PrfA 蛋白的调控。在 Lm 中,PrfA 是主要的毒力基因调控蛋白,能正调控绝大多数的毒力基因(如 *hly*、*actA* 等)的转录[12-13],以及部分调控鞭毛蛋白的表达[14]。在病原微生物中,鞭毛的运动性对细菌在宿主中的生存至关重要,在趋化因子的帮助下,能向有利于自己生存环境的方向(如温度、营养等)移动[15]。鞭毛也可作为黏附素,将细菌黏附到宿主表面[16],因此,鞭毛的运动性对胃肠道病原微生物的毒力起着重要的作用[17]。最近,有学者利用转录组学的方法报道了全局转录调控因子 CodY 能参与 Lm 中许多生命活动的调控(如鞭毛运动、氨基酸转运、毒力等),但调控的具体分子机制尚不清楚[18-21]。

本研究通过同源重组的方法构建了 CodY 缺失突变株 EGDeΔ*codY* 以及高拷贝质粒表达回复菌株 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY*;比较分析了野生株 EGDe、

收稿日期:2017-02-13　　修回日期:2017-03-11
* 国家自然科学基金(31571931)、华中师范大学中央高校基本科研业务费(CCNU15A02026)资助项目
** 通讯作者,电子信箱:qinluo@mail.ccnu.edu.cn

EGDeΔcodY 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 三种菌株的鞭毛运动能力、与鞭毛运动相关基因的转录表达、细菌溶血活性及主要毒力因子的转录表达差异,从而深入探讨 CodY 对 Lm 鞭毛运动和毒力因子调控的分子机制。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　菌株与质粒　单核细胞增生李斯特菌野生菌株 EGDe(血清型 1/2a,全基因组序列已知[22])和温度敏感型穿梭整合质粒 pLSV101 以及高拷贝表达质粒 pERL3 为德国维尔茨堡大学微生物系 Werner Goebel 教授馈赠。如无特殊说明,细菌均在 BHI 培养基中 37℃ 震荡培养。

1.1.2　引物　引物见表 1。

表 1　本实验中所用到的引物

Table 1　The primersin this study

Primers	Sequences(5′-3′)
P1:*codY*-A-*Bam*HI-F	GCGGATCCTAAACAATACAAAGCTTTAC
P2:*codY*-A- R	CACTGTTGACAGTTCTTGGCGTTCTGTAAGCAT
P3:*codY*-B-F	GAACTGTCAACAGTGTACAGTGAATTAGAAGCG
P4:*codY*-B-*Eco*RI-R	CGAATTCTTTCAATTAATCTTGTTCGAC
P5:*codY*-ck-F	ATATCGGAGCAAGAAGACT
P6:*codY*-ck-F	ATTCCAAATTCCTCCAGTCA
P7:C*codY*-*Xho*lI-F	GCCTCGAGATTAATTGATGCGGATGA
P8:C*codY*-*Bam*HI-R	GTAGGATCCATGCACGTCTAATACCG
P9:pERL3-ck-F	GAAAACCGCTACGGATCACATC
P10:pERL3-ck-R	CCAACCTGCCATCACGAGATTT
P11:*motA*-F	TGGAAGAACGTCATGCTGCT
P12:*motA*-R	GTTCGACATTTCGCCCATCG
P13:*motB*-F	AATCGCCAAAGAAATCGGCG
P14:*motB*-R	GGCGACACTTAGTTCCCAGT
P15:fl*iP*-F	TGAATGTGCATGCCGAGAGT
P16:*fliP*-R	ACAAACAGCGCCACACTAGA
P17:*flhA*-F	ATGAACTCCTGATGCGCCAA
P18:*flhA*-R	GTTGTCGTAGCACCCCTTGA
P19:*fliE*-F	ACCGCGAAAACAGACAATGC
P20:*fliE*-R	TACGGAAGTTTGCGCGTTTG
P21:*rpoB*-F	ATGCTTTCCGCAGACGAAGA
P22:*rpoB*-R	TTTCAGCGGCTGCATTTTCC
P23:*prfA*-F	CAGGCTACCGCATACGTTATCAAA
P24:*prfA*-R	AGCCAAGCTTCCCGTTAATCGAAA
P25:*hly*-F	TTGGGAATGGTGGAGAACGG
P26:*hly*-R	TGGTGCCCCAGATGGAGATA

1.2　EGDeΔ*codY* 缺失突变株和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 回复突变株的构建

1.2.1　EGDeΔ*codY* 缺失突变株的构建　首先采用 SOEingPCR[13] 方法构建用于同源重组的穿梭质粒 pLSV101-*codY*(A + B):以 EGDe 基因组 DNA 为模板使用引物对 P1/P2 和 P3/P4 分别扩增 *codY* 基因上下游同源臂 A(515bp)和 B(467bp);PCR 产物纯化后作为模板,以 P1/P4 引物对进行第二次 PCR,从而获得含有

*Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切位点的 AB 融合片段 *codY*(A + B)(982bp),双酶切后将融合片段 *codY*(A + B)连接到质粒 pLSV101 上,得到质粒 pLSV101-*codY*(A + B)。然后按照王莉等[23]的方法将其电转入 EGDe 感受态细胞中,进行同源重组和筛选 *codY* 基因缺失突变子 EGDeΔ*codY*。所得突变子经 PCR(以 *codY* 基因上下游引物对 P5/P6 PCR 扩增 EGDeΔ*codY* 中的 *codY* 基因片段,以 EGDe 基因组为对照来验证 *codY* 基因的缺失)和测序验证为正确突变。

1.2.2 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 回复突变株的构建 以 EGDe 基因组 DNA 为模板使用引物对 P7/P8 扩增出 C 片段(包含 *codY* 基因 ORF 和启动子在内的 1 739bp片段),*Xho*lI 和 *Bam*HI 双酶切后,将 C 片段连接到多拷贝质粒 pERL3 上,构建 *codY* 基因的重组表达质粒 pERL3-codY。然后将其电转入 EGDeΔ*codY* 感受态细胞中,使用引物对 P9/P10 进行 PCR 检测和测序验证。

1.3 细菌生长曲线的测定

挑取待测菌株的单克隆于 5ml BHI(Brain Heart Infusion, 购自 B&D 公司)培养基中过夜培养,第二天,取其 1ml 接入新鲜的 100ml BHI 培养中,混匀后,采用分光光度计(Eppendorf BioPhotometer Plus)测定菌液此时的 OD_{600},记为 0h 的值,继续震荡培养,每隔 1h 检测菌液 OD_{600} 的变化,直至细菌生长状态达到稳定期。实验重复 3 次,数据采用 Origin6.1 分析处理。

1.4 细菌鞭毛运动性和鞭毛相关基因表达实验

1.4.1 细菌鞭毛穿刺实验 采用半固体琼脂穿刺法观察细菌鞭毛的运动性:用直的接种针蘸取少量过夜活化的菌液(25℃,180r/min 震荡培养)穿刺接种于 BHI 半固体培养基(0.5% 的琼脂)中,25℃ 静置培养一周,每天拍照记录。如果细菌在半固体培养基中能扩散形成倒伞状结构,则判定该细菌鞭毛具有运动性。

1.4.2 细菌鞭毛平板运动性实验 将待测菌株过夜活化(25℃,180r/min 震荡培养),取 1μl 菌液点样于 BHI 半固体平板(0.3% 琼脂)上[24],25℃ 静置培养 48h 后,测定细菌运动所形成圆圈的直径大小并拍照记录。实验重复三次。

1.4.3 qRT-PCR 检测与鞭毛形成和运动相关基因的转录表达实验 将待测菌液培养到对数前期 OD_{600} 达 0.7(25℃震荡培养),离心收集菌提取总 RNA,按照反转录试剂盒(TaKaRa)操作说明将总 RNA 反转录成 cDNA。将所得 cDNA 稀释 10 倍作为模板,以管家基因 *rpoB* 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的分析方法和 SPSS17.0 软件处理数据。实验重复三次。

1.5 细菌毒力实验

1.5.1 细菌溶血活性检测 参照于新惠等[25]的方法:取 1ml 无菌脱纤维绵羊血,2 600r/min 离心 5min,弃上清。用生理盐水洗涤血细胞沉淀,清洗三次。用 50 倍体积生理盐水重悬血细胞,并以 1ml 每支分装于 1.5ml 离心管中。将待测菌液在 BHI 中培养到 OD_{600} 达 1.0 时,分别取待测菌液 30μl、50μl、100μl 加入装有 1ml 血细胞的离心管中,37℃ 静置培养 30min 后,2 600r/min 离心 5min,收集上清,检测 OD_{543nm} 处吸光度值。以只含有血细胞的上清作为阴性对照,以加入了等量无菌水的上清作为阳性对照。实验重复三次。数据采用 Origin6.1 分析处理。

1.5.2 细菌对棉铃虫幼虫的毒性实验 将待测菌液培养到 OD_{600} 达 0.7,用 BHI 培养基进行 3 倍梯度稀释成 6 个不同浓度(菌液的稀释倍数为 3^0、3^1、3^2、3^3、3^4、3^5),每个浓度 5μl,分别注射 18 条生理状态一致的 5 龄棉铃虫幼虫,连续 3 天,观察和统计棉铃虫幼虫的死亡条数,并计算细菌对棉铃虫幼虫的半致死剂量 LD_{50}。采用 SPSS17.0 分析处理所得数据。

2 实验结果

2.1 EGDeΔ*codY* 缺失突变株和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 回复突变株的构建

2.1.1 EGDeΔ*codY* 缺失突变株的构建 如图 1 所示,用 *codY* 基因两端以引物对 P5/P6 进行 PCR 扩增,以 EGDeΔ*codY* 为模板所得片段比以 EGDe 基因组为模板短约 330bp,其长度与预期结果一致,表明 EGDeΔ*codY* 成功缺失了 *codY* 基因,同时 DNA 测序也进一步验证了 EGDeΔ*codY* 构建成功。

2.1.2 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 回复突变株的构建 如图 2 所示,用 pERL3 质粒两端引物对 P9/P10 进行 PCR 扩增,以 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 为模板所得片段与以 pERL3-*codY* 重组质粒为模板所得片段大小一致(2 089bp),与预期结果相符。表明 pERL3-*codY* 重组质粒已成功电转入 EGDeΔ*codY* 感受态细胞中,EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 回复突变株构建成功。

2.2 CodY 缺失对单核细胞增生李斯特菌生长的影响

如图 3 所示,在营养丰富的 BHI 培养基中,三种菌株生长快速且生物量较高。与野生型菌株 EGDe 相比,

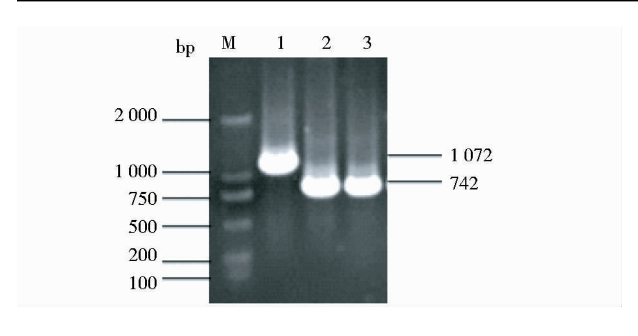


图 1　PCR 验证 EGDeΔ*codY* 中 *codY* 基因的缺失

Fig. 1　Verification of the deletion of *codY* in EGDeΔ*codY* by PCR

M: Marker; 1: EGDe; 2: pLSV101-*codY*(A+B); 3: EGDeΔ*codY*

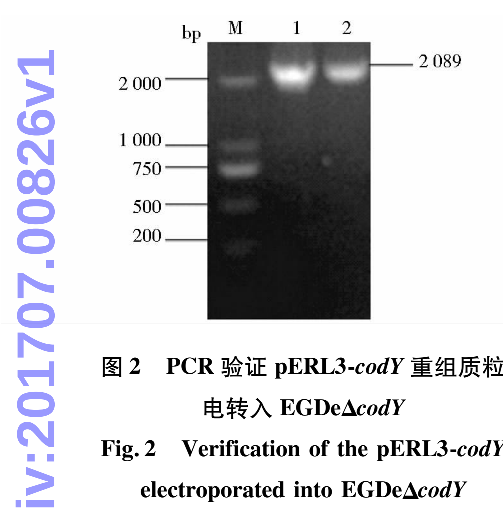


图 2　PCR 验证 pERL3-*codY* 重组质粒电转入 EGDeΔ*codY*

Fig. 2　Verification of the pERL3-*codY* electroporated into EGDeΔ*codY*

M: Marker; 1: pERL3-*codY*; 2: EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY*

EGDeΔ*codY* 在对数中期生长较慢,在对数前期和稳定期的生长状况并无显著差异,而 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 与 EGDeΔ*codY* 的生长趋势一致,并未回复到野生型水平,推测 pERL3 为多拷贝的表达质粒,CodY 的过量表达可能会影响细菌中某些氨基酸的合成,从而对生长产生一定的影响。

2.3　CodY 缺失对单核细胞增生李斯特菌鞭毛运动和鞭毛相关基因表达的影响

2.3.1　比较 EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 的鞭毛运动状况　如图 4a 所示,在 BHI 半固体培养基中,EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 都能形成倒伞状结构,三种菌株的鞭毛均具有运动性;如图 4b 和表 2 所示,在含 0.3% 琼脂的 BHI 半固体平板培养 48h 后,与 EGDe 相比,EGDeΔ*codY* 在平板上泳动所形成圆圈的直径显著变小,EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 菌株所形成的直径大小与野生型菌株基本一致。以上结果表明 CodY 的缺失降低了细菌鞭毛的运动性。

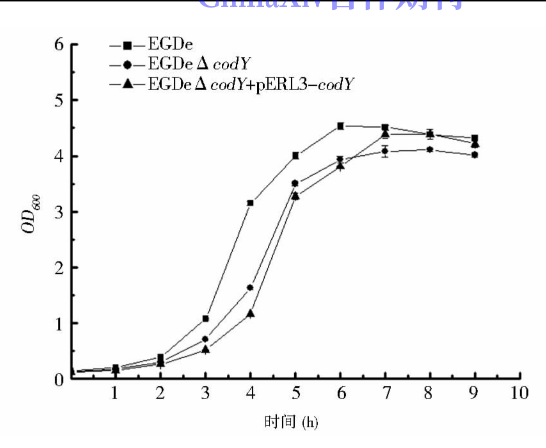


图 3　EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 生长曲线的比较

Fig. 3　Comparison of the growth curves of EGDe, EGDeΔ*codY* andEGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* cultured in BHI

表 2　EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 平板泳动实验结果

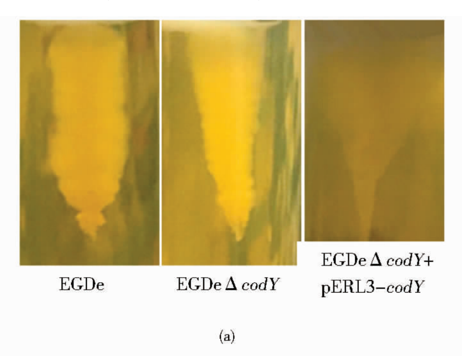
Table 2　Swarming of EGDe, EGDeΔ*codY* and EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* on soft agar plates

Strain	Diameter(mm) ± SDa①
EGDe	8.33 ± 0.58
EGDeΔ*codY*	6.67 ± 0.58 *
EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY*	8.67 ± 0.58

Note: ① Values are averages of triplicate experiments. * : Significant differences between the mutant strain and the wild-type ($P \leqslant 0.05$). SD: Standard deviation

2.3.2　鞭毛形成和运动相关基因在 EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 中的转录表达　挑选与鞭毛形成和运动相关基因 *motB*、*motA*、*fliE*、*flhA*、*fliP* 进一步做 RT-qPCR 检测,*motA* 和 *motB* 是与鞭毛运动相关的基因,而 *fliE*、*flhA* 和 *fliP* 是与鞭毛结构形成相关的基因。结果如图 5 所示,与野生型菌株 EGDe 相比,*motA*、*motB*、*fliE* 在 EGDeΔ*codY* 中表达量显著降低,fliP 在 EGDeΔ*codY* 中表达量显著升高。除 flip 外,其它与鞭毛运动和形成相关的基因在 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 中的转录表达均基本回复到野生型菌株的水平。以上结果表明,缺失 CodY 后,*motA* 和 *motB* 的表达量下降,其鞭毛运动性降低;但与鞭毛结构相关的基因 *fliE* 的表达量显著下降,*flhA* 基本不变,*fliP* 的表达量却极大升高,暗示 CodY 缺失对鞭毛形成的影响较为复杂,对不同基

因的调控途径可能不同，但总体来说，CodY 的缺失能降低鞭毛的运动性。



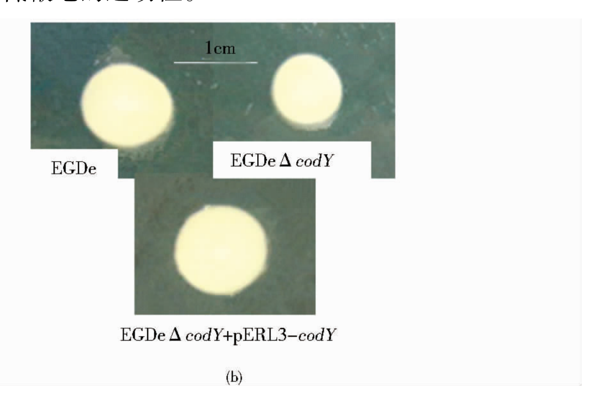


图 4 EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 鞭毛运动性的比较

Fig. 4 Comparison of the flagellar motility of EGDe, EGDeΔ*codY* and EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY*

（a）Results of flagellar puncture of three strains （b）Swarming of three strains on soft agar plates

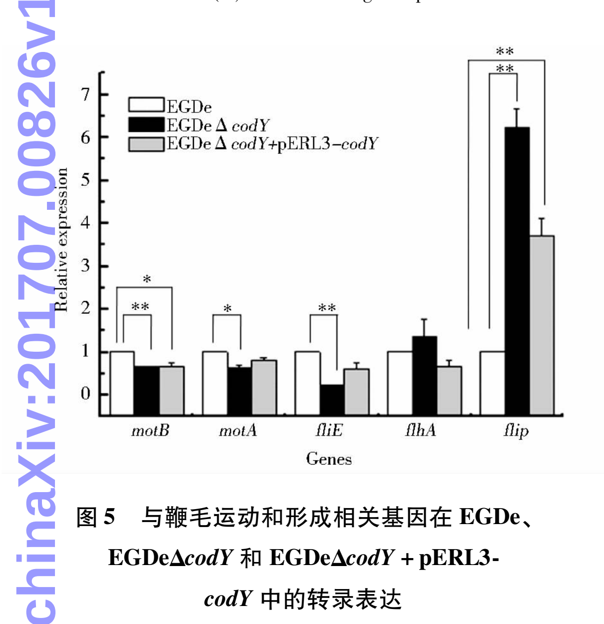


图 5 与鞭毛运动和形成相关基因在 EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 中的转录表达

Fig. 5 The relative expression of the genes related to flagellar movement and formation in the EGDe, EGDeΔ*codY* and EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY*

2.4 CodY 对单核细胞增生李斯特菌毒力的影响

2.4.1 主要的毒力基因 *prfA* 和 *hly* 在 EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 中的转录表达 如前所述，在 Lm 中，PrfA 能调控绝大多数毒力因子的转录表达，细菌溶血活性蛋白(LLO)是 Lm 中最主要的毒力因子之一。为探究 CodY 对 Lm 毒力的影响，我们比较了 PrfA 的编码基因 *prfA* 和溶血素 LLO 的编码基因 *hly* 在三种菌株中的转录表达情况。结果如图 6 所示，与野生型菌株 EGDe 相比，*prfA* 和 *hly* 在 EGDeΔ*codY* 中的表达量显著降低，表明 *codY* 基因的缺失可能导致 EGDeΔ*codY* 菌株的细菌毒力降低。但有趣的是，*prfA* 和 *hly* 在 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 中的表达量并没有如预期一样回复到野生株水平，反而比 CodY 缺失株更为降低，暗示 CodY 对细菌毒力的调控可能与其表达量相关，由于我们所用的回复表达质粒为多拷贝质粒，回复菌株中 CodY 蛋白的过量表达可能会抑制 *prfA* 和 *hly* 的表达。

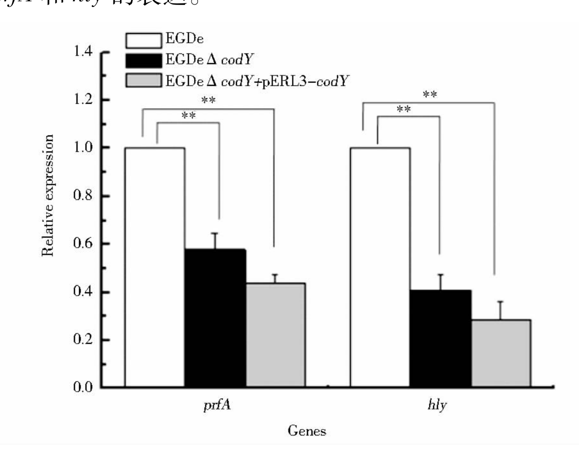


图 6 毒力基因 *prfA* 和 *hly* 在 EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 中的转录表达

Fig. 6 The relative transcription expression of the major virulence genes *prfA* and *hly* in the EGDe, EGDeΔ*codY* and EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY*

2.4.2 CodY 对单核细胞增生李斯特菌溶血活性的影响 为了从蛋白质水平进一步验证 *codY* 基因的缺失将导致细菌毒力的降低，我们比较了细菌溶血素在 EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 中的活性差异。结果如图 7 所示，随着菌液量的增加，细菌中 LLO 的浓度升高，溶血活性也随之上升，当菌液量为

30μl、50μl、100μl 时，与野生型菌株 EGDe 相比，EGDeΔ*codY* 和 *EGDeΔcodY* + pERL3-*codY* 的溶血活性显著性降低，此结果与 hly 转录水平的结果一致，表明 *codY* 基因的缺失能导致 Lm 主要毒力基因 *hly* 转录和翻译水平的下降，从而导致 Lm 毒力降低。

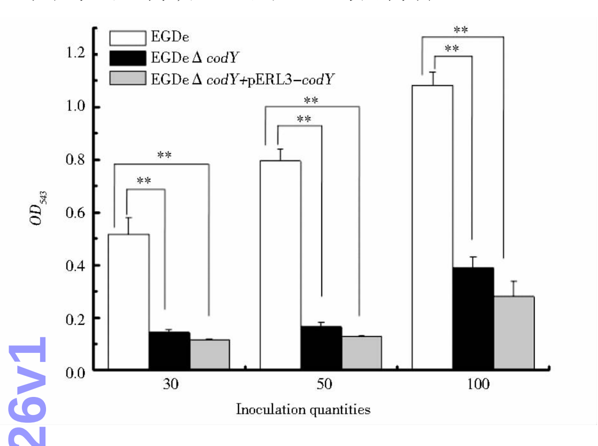


图 7　EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 的溶血活性

Fig. 7　Hemolytic activity of EGDe, EGDeΔ*codY* and EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY*

2.4.3　CodY 对单核细胞增生李斯特菌侵染棉铃虫幼虫的影响　以上结果表明，*codY* 基因的缺失能够导致 Lm 毒力降低。为从活体水平更进一步确证该结论，我们开展了细菌侵染棉铃虫幼虫的毒力实验。如实验方法所述，我们分别将同等剂量（菌液体积和菌液数目）的 EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 注射入生理状态一致的 5 龄棉铃虫腹部，以同等剂量的 PrfA 蛋白组成性高表达突变株 *prfA**（高毒株）为阳性对照，以同等体积的不含细菌的培养基 BHI 及缓冲液 PBS（pH 7.2）为阴性对照。结果如表 3 所示，注射了 BHI 和 PBS 的棉铃虫幼虫 3 天中无 1 例死亡（3 天后也没有死亡，并可正常化蛹孵化，该数据未显示），而高毒株 *prfA** 和野生株 EGDe 能够造成棉铃虫幼虫死亡，且 *prfA** 对棉铃虫幼虫的致死率显著高于 EGDe。同时，与 EGDe 相比，EGDeΔ*codY* 的半致死剂量（LD_{50}）上升了 5.8 倍。而 CodY 回复菌株对棉铃虫的半致死剂量虽比 EGDeΔ*codY* 低，但并没有回复到野生菌株的水平。以上结果不仅确证了 *codY* 基因的缺失能够使 Lm 毒力降低，同时也表明棉铃虫可以作为研究单核细胞增生李斯特菌侵染机制的动物模型。

表 3　*prfA、EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 对棉铃虫的半致死剂量（LD_{50}）**

Table 3　The semi-lethal dose of *prfA, EGDe, EGDeΔ*codY* and EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* inHelicoverpa armigera (Hübner)**

Strain	LD_{50} (cfu)
BHI	—（死亡条数为 0）
PBS	—（死亡条数为 0）
*prfA**	1.03×10^3
EGDe	2.69×10^5
EGDeΔ*codY*	1.85×10^6
EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY*	6.33×10^5

Note: LD_{50} represents a half lethal dose

3　讨　论

全局性转录调控因子 CodY 广泛存在于低 G + C 含量的革兰氏阳性菌中，它能参与细菌许多生命活动的调节（如氨基酸合成与转运、糖代谢、鞭毛运动、毒力等）。我们的实验证明缺失 CodY 后，与鞭毛运动直接相关的基因 *motA* 和 *motB* 的表达量显著降低，该结果与 CodY 缺失菌株在软琼脂上运动性降低相一致；而 *fliE* 和 *flip* 都是与鞭毛结构形成相关的基因，主要是参与鞭毛的基体（basal body）和钩形鞘（hook）的形成。在很多细菌（如大肠杆菌）中，与鞭毛结构形成相关的基因（如 *fliE*、*fliP*、*flhA* 和 *flhB*）和与鞭毛运动直接相关的基因（如 *motA*、*motB*、*flgMN*、*fliDST*）位于不同的操纵子上并受到不同的 sigma 因子的调控[26-28]。在本实验中，缺失 CodY 后，*fliE* 的表达量显著降低，*flip* 的表达量显著增高，暗示 CodY 的缺失对鞭毛形成的影响较为复杂，可能对不同基因的调控存在不同的调控方式。但是，我们镜检观察 CodY 缺失菌株的鞭毛，并没有发现明显改变（数据未显示）。以上结果显示 CodY 的缺失从总体上降低了细菌的运动性。鞭毛的运动有助于细菌向有利于自己生存的环境方向移动，因此，CodY 在细菌感应营养物质信号和逃脱不利生存环境的方面起着重要作用。

CodY 能参与细菌（如枯草芽孢杆菌）毒力基因的表达调控。我们的实验证明缺失 CodY 后，Lm 主要的毒力基因调控蛋白 PrfA 和毒力因子 LLO 的转录表达显著降低，细菌的溶血活性显著下降，对棉铃虫的半致死剂量显著增高。以上实验结果能显示：缺失 CodY

后,细菌毒力下降。该结果与 Lobel 和 Herskovits[24] 最新的研究结果高度一致。暗示 CodY 可能通过直接调控毒力基因调控蛋白 PrfA 的表达,间接调控 Lm 中其他毒力基因的表达。有趣的是,CodY 缺失回复菌株的溶血活性,以及 PrfA 和 LLO 在该菌中的转录表达均未回复到野生型水平,而鞭毛运动以及大多数相关基因的转录表达在回复菌株中能达到野生株水平,表明 CodY 的缺失并没有造成菌株的极性效应。因此,我们推测,在回复菌株中,由于表达 CodY 的 pERL3 为多拷贝质粒,造成 CodY 组成性过量表达,可能在一定程度上抑制了细菌中毒力基因的转录,使回复菌株中的毒力不能达到野生型水平。当我们进一步检测 CodY 蛋白在 EGDe、EGDeΔ*codY* 和 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 三种菌株中的表达情况时,发现缺失菌株 EGDeΔ*codY* 中不表达 CodY,而在回复菌株 EGDeΔ*codY* + pERL3-*codY* 中 CodY 的表达水平显著高于野生株 EGDe(数据未显示),与我们的预期一致,但具体的机制还需要进一步的探讨,这也将是我们今后研究的重点之一。

综上所述,我们的研究结果表明,CodY 在鞭毛运动和细菌毒力方面具有重要的作用。

参考文献

[1] Sonenshein A L. CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. Curr Opin Microbiol, 2005, 8(2): 203-207.

[2] Molle V, Nakaura Y, Shivers R P, et al. Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-widetranscript analysis. J Bacteriol, 2003, 185(6): 1911-1922.

[3] Sonenshein A L. Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. Nat Rev Microbiol, 2007, 5(12): 917-927.

[4] Claverys J P, Prudhomme M, Martin B. Induction of competence regulons as general stress responsesin Gram-positive bacteria. Annu Rev Microbiol, 2006, 60(1): 451-475.

[5] Majerczyk C D, Dunman P M, Luong T T, et al. Directtargets of CodY in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2010, 192(11): 2861-2877.

[6] Majerczyk C D, Sadykov M R, Luong T T, et al. *Staphylococcu saureus* CodY negatively regulates virulence geneexpression. J Bacteriol, 2008, 190(7): 2257-2265.

[7] PohlK, FrancoisP, Stenz L, et al. CodY in *Staphylococcus aureus*: a regulatorylink between metabolism and virulence geneexpression. J Bacteriol, 2009, 191(9): 2953-2963.

[8] Ramaswamy, Cresence V, Rejitha V M, et al. *Listeria*--review of epidemiology and pathogenesis. Microbiol Immunol Infect, 2007, 40(1): 4-13.

[9] Rocourt J, BenEmbarek P, Toyofuku H, et al. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2003, 35(3): 263-267.

[10] Vazquez-Boland J A, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria pathogenesis* and molecular virulence determinants. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14(3): 584-640.

[11] Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, et al. Prophage excision activates *Listeria* competence genes that promote phagosomal escapeand virulence. Cell, 2012, 150(4): 792-802.

[12] Heras A, Cain R J, Bielecka M K, et al. Regulation of *Listeria* virulence: PrfAmaster and commander. Curr Opin Microbiol, 2011, 14(2): 118-127.

[13] Luo Q, Zhou Q C, Deng L F, et al. Some essential elements on the inlC promoter for PrfA-dependent regulation in *Listeria monocytogenes*. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(1): 22-28.

[14] Salazar J K, Wu Z, McMullen P D, et al. PrfA-like transcription factor gene lmo0753 contributes to L-rhamnose utilization in *Listeria monocytogene* strains associated with human food-borne infections. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(18): 5584-5592.

[15] Wadhams G H, Armitage J P. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. NAT Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(12): 1024-1037.

[16] Giron J A, Torres A G, Freer E, et al. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. Mol Microbiol, 2002, 44(2): 361-379.

[17] Josenhans C, Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. Int J Med Microbiol, 2002, 291(8): 605-614.

[18] Geiger T, Wolz C. Intersection of the stringent response and the CodY regulon in low GC Gram-positivebacteria. Int J Med Microbiol, 2014, 304(2): 150-155.

[19] Sonenshein A L. Cod Y, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. Current Opinion in Microbiology, 2005, 8(2): 203-210.

[20] Stenz L, Francois P, Whiteson K, et al. The CodY pleiotropic repressor controlsn virulence in gram-positive pathogens. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2011, 62(2): 123-139.

[21] Bennett H J, Pearce D M, Glenn S, et al. Characterization of relA and codY mutants of *Listeria monocytogenes*: identification of the CodY regulon and its role in virulence. Mol Microbiol, 2007, 63(5): 1453-1520.

[22] Glaser P, Frangeul L, Bunchrieser C, et al. Comparative genomics of *Listeria* species. Science, 2001, 294(26): 849-852.

[23] 王莉，冯飞飞，张强，等. 单核细胞增生李斯特菌毒力基因 inlB/actA 双缺失突变株的构建. 生物技术通报，2010，0(11)：182-185.
Wang L，Feng F F，Zhang Q，et al. Construction of a mutant strain of *Listeria monocytogenes* with a deletion of inlB and actA. Biotechnology Bulletin，2010，0(11)：182-185.

[24] Lobel L，Herskovits A A. Systems level analyses reveal multiple regulatory activities of CodY controlling metabolism，motility and virculence in *Listeria monocytogenes*. PLoS Genet，2016，12(2)：45-72.

[25] 于新惠，张颖，王文静，等. *rmlB* 基因在单核细胞增生李斯特菌耐药性、生物被膜形成和毒力方面的研究. 微生物学通报，2017，44(1)：161-171.
Yu X H，Zhang Y，Wang W J，et al. Contribution of *rmlB* in envelope-acting a antibiotic resistance biofilm formation and virulence in *Listeria monocytogenes*. Microbiology China，2017，44(1)：161-171.

[26] Metlina A L. Prokaryotic flagella as biological motility system. Uspekhi Biol Khim，2001，41(2)：229-282.

[27] Keseler I M，Collado-Vides J，Santos-Zavaleta A，et al. EcoCyc：a comprehensive database of *Escherichia coli* biology. Nucleic Acids Res，2011，39(3)：583-590.

[28] Chilcott G S，Huqhes K T. Coupling of the flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmon ellaenterica*，serovar typhimurium and *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev，2000，64(4)：694-708.

The Role of CodY in the Regulation of Flagellar Motility and Virulence in *Listeria monocytogenes*

ZHANG Ying　TANG Yu-qian　SHEN Yi　LUO Qin

(Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology，College of Life Sciences，Central China Normal University，Wuhan　430079，China)

Abstract　Objective：To explore the function of the transcription factor CodY on flagellar motility，bacterial virulencein *Listeria monocytogenes*. Methods：The *codY* gene on the *L. monocytogenes* chromosome was knocked out by homologous recombination and the strain of the deleted *codY* gene was successfully complemented by the *codY* gene construct；the results were evaluated by observation of the motilityof flagellar movement，the transcriptional expression of flagellum-related genes with RT-qPCR. The effects of wild-type strain EGDe and CodY-deficient strain on bacterial hemolytic activity，semi-lethal dose of *Helicoverpa armigera* and the main virulence factor LLO(coding gene *hly*) and virulence regulatory protein PrfA(coding gene *prfA*) transcription expression profiles were compared. Results：Compared with the wild-type strain，the CodY-deficient strain showed a significant reduction in the flagellar movement，the hemolytic activity，as well as the transcriptional expression of flagellum-related genes and the major virulence genes *hly* and *prfA*($P \leqslant 0.01$)；while the semi-lethal dose on *Helicoverpa armigera* (Hübner) was increased 5.8 fold. Conclusion：The CodY plays an important role in flagellar motility and transcription regulation ofbacterial virulence in *Listeria monocytogenes*.

Key words　*Listeria monocytogenes*　CodY　Flagellar motility　Virulence